

PENGARUH SUHU PRODUKSI TERHADAP AKTIVITAS EKSTRAK KASAR BAKTERIOSIN DARI BERBAGAI GALUR *Lactobacillus* sp. DALAM MENGHAMBAT *Escherichia coli* DAN *Staphylococcus aureus*

EFFECT OF TEMPERATURE ON INHIBITORY ACTIVITY OF CRUDE EXTRACT BACTERIOCIN PRODUCED BY DIFFERENT STRAINS OF *Lactobacillus* sp. ON SURVIVAL OF *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus*

Abubakar^{1*} dan Muhammad Arpah²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor, 16114

²Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor, 16680

Submitted: 6 May 2015, Accepted: 16 September 2015

INTISARI

Sistem biopreservasi pangan mulai menarik perhatian di kalangan industri dan konsumen. Penggunaan bakteri asam laktat dan/atau senyawa bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat sudah dinyatakan aman (*generally recognize as safe*). Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan aktivitas penghambatan ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211, SCG 1221, dan SCG 1223; serta untuk mengetahui pengaruh suhu pemanasan pada temperatur 80°C dan 100°C. Produksi bakteriosin pada penelitian ini menerapkan prinsip adsorpsi-desorpsi. Aktivitas penghambatan ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekeliling sumur agar. Hasil penelitian menunjukkan suhu pemanasan tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas penghambatan ($P>0,05$). Aktivitas hambat tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak kasar bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211, yaitu sebesar 840,90 AU/ml terhadap *Escherichia coli* dan 979,12 AU/ml terhadap *Staphylococcus aureus*.

(Kata kunci: Adsorpsi-desorpsi, Aktivitas penghambatan, Bakteriosin, Biopreservasi, *Lactobacillus* sp.)

ABSTRACT

*The biopreservation systems are recently of food industries and consumers attract. Lactic acid bacteria and/or their isolated bacteriocins are considered as generally recognize as safe (GRAS). It is useful to control the frequent development of pathogens and spoilage microorganisms in foods. This study was aimed to compare the activity of crude extract bacteriocins from *Lactobacillus* sp. strain SCG 1211, SCG 1221, and SCG 1223, which suppressed the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*; and to compare the effect of heating temperature at 80°C and 100°C. Adsorption-desorption method was applied in the production step. The inhibitory activities of the bacteriocins were indicated by the presence of a transparent zone surrounding the agar wells. The result showed that inhibitory activities of crude extract bacteriocin were not affected by heating temperature ($P>0.05$). The highest activity was shown by crude extract bacteriocin from *Lactobacillus* sp. strain SCG 1211, with the activity at 840.90 AU/ml towards *Escherichia coli* and 979.12 AU/ml towards *Staphylococcus aureus*.*

(Key words: Adsorption-desorption, Bacteriocin, Biopreservative, Inhibitory activity, *Lactobacillus* sp.)

* Korespondensi (*corresponding author*):

Telp. +62 857 7259 9704

E-mail: abu.028@gmail.com

Pendahuluan

Salah satu masalah yang menjadi perhatian di industri pangan adalah kontaminasi pangan oleh patogen, khususnya pada jenis pangan *perishable* (mudah membusuk) seperti daging dan karkas ayam. Penggunaan agensia pengawet biasanya diaplikasikan untuk mencegah terjadinya kontaminasi oleh mikrobial patogen maupun mikrobial pembusuk, sehingga dapat memperpanjang umur simpan produk pangan. Penggunaan pengawet kimia pada produk pangan masih diragukan keamanannya karena meninggalkan residu kimia dalam tubuh manusia. Penggunaan pengawet kimia pada produk pangan mulai digantikan dengan biopreservatif. Penggunaan mikrobial non-patogen dan/atau senyawa metabolitnya untuk meningkatkan keamanan mikrobiologis produk pangan serta untuk memperpanjang umur simpan produk pangan didefinisikan sebagai biopreservasi (De Martinis *et al.*, 2001).

Bakteriosin merupakan salah satu agen biopreservasi, berupa protein atau peptida antimikrobial yang dihasilkan oleh bakteri, disintesis secara ribosomal, dan dapat membunuh mikrobial yang memiliki kedekatan secara filogenik dengan mikrobial produsernya (Klaenhammer, 1993).

Bakteriosin dapat dihasilkan dari berbagai jenis bakteri, baik dari kelompok gram negatif maupun gram positif. Bakteriosin yang diproduksi oleh bakteri gram negatif memiliki aktivitas hambat relatif sempit, sedangkan bakteriosin yang diproduksi bakteri gram positif memiliki aktivitas hambat relatif lebih luas dalam menghambat bakteri gram positif maupun gram negatif (De Vuyst dan Leroy, 2007). Bakteri gram positif yang digunakan sebagai produsen bakteriosin umumnya berasal dari kelompok bakteri asam laktat (BAL). Bakteriosin yang dihasilkan BAL dapat mengalami degradasi oleh enzim proteolitik dalam pencernaan manusia, sehingga tidak membahayakan bagi kesehatan manusia. Oleh karena itu, bakteriosin berpotensi untuk menggantikan peran agensia pengawet kimia dalam industri pangan.

Bakteriosin umumnya menunjukkan kestabilan aktivitas pada pengaruh suhu dan pH (Nurhasanah, 2004), namun sensitivitasnya terhadap suhu maupun pH akan berbeda setiap jenisnya. Pada kondisi asam maupun

basa, bakteriosin tetap menunjukkan aktivitas yang stabil. Bakteriosin juga menunjukkan aktivitas yang stabil setelah diberikan perlakuan pada suhu -20°C sampai 100°C. Oleh karena itu, bakteriosin dapat digunakan sebagai agensia pengawet pada industri pangan yang umumnya melibatkan pengaturan suhu dan pH (Nurhasanah, 2004).

Proses produksi bakteriosin dipengaruhi oleh beberapa faktor: jenis bakteri produser, kondisi fermentasi, pH produksi, suhu produksi, keberadaan enzim proteolitik, dan komposisi nutrisi media pertumbuhan (Todorov dan Dicks, 2004). Produksi bakteriosin biasanya dilakukan pada media sintetik seperti MRSB (*de Man, Rogosa, dan Sharpe Broth*), TGE (*Tryptone Glucose Extract Yeast*), atau media sintetik lainnya. Namun, pada umumnya media sintetik yang digunakan dalam produksi bakteriosin yang dihasilkan BAL adalah media MRSB. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu pemanasan yang digunakan dalam produksi bakteriosin terhadap aktivitas bakteriosin, serta untuk membandingkan kemampuan aktivitas bakteriosin dari beberapa galur bakteri asam laktat yang digunakan dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) dan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

Materi dan Metode

Mikrobial yang digunakan sebagai kultur produser bakteriosin adalah kultur cair *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211, SCG 1221 dan SCG 1223 koleksi Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor, hasil peremajaan dari isolat yang diisolasi oleh Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetika Bogor. Ketiga kultur merupakan hasil isolasi dari susu murni. Mikrobial yang digunakan sebagai bakteri indikator dalam pengujian aktivitas hambat ekstrak kasar bakteriosin adalah *S. aureus* dan *E. coli*. Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah *Nutrient Broth* (Criterion), *de Man, Rogosa, and Sharpe* (MRS) *Broth* (Oxoid), *MRS Agar* (Oxoid), *Plate Count Agar* (Oxoid), dan ekstrak khamir (Bacto™). Bahan kimia yang digunakan adalah NaCl (Merck), NaOH (Merck), HCl (Merck), alkohol 76%, buffer fosfat pH 7,00 dan pH 4,00.

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu peremajaan dan penghitungan jumlah koloni masing-masing kultur, produksi bakteriosin dan pengujian aktivitas hambat ekstrak kasar bakteriosin terhadap bakteri indikator.

Peremajaan kultur

Sebanyak 1 ml kultur BAL diinokulasi ke dalam 9 ml media MRSB dengan pengkayaan 3% ekstrak khamir. Inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Hal serupa juga dilakukan pada kultur *E. coli* dan *S. aureus*. Sebanyak 1 ml kultur diinokulasi ke dalam 9 ml media NB, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (FDA, 2001).

Penghitungan populasi kultur dengan metode *aerobic plate count*

Analisis populasi kultur menggunakan metode FDA (2001). Sebanyak 1 ml hasil peremajaan kultur diencerkan dalam 9 ml larutan garam fisiologis. Pengenceran dilakukan hingga tingkat pengenceran kesembilan untuk kultur BAL, sedangkan kultur bakteri indikator diencerkan hingga tingkat pengenceran keempat belas. Sebanyak 1 ml dari masing-masing pengenceran ditumbuhkan pada 20-25 ml media agar dengan cawan tuang. Media agar yang digunakan untuk pengenceran kultur BAL adalah MRSA, sedangkan bakteri indikator menggunakan media PCA. Setelah membeku, cawan diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam untuk bakteri indikator dan selama 24-48 jam untuk BAL, kemudian dilakukan penghitungan koloni pada cawan yang memiliki jumlah 25-250 koloni dan dijumlahkan dengan persamaan sebagai berikut:

$$N = \frac{\sum \text{Koloni}}{(1 \times n1) + (0,1 \times n2)} \times d$$

Keterangan:

N = jumlah koloni per ml

n1 = jumlah cawan terhitung pada pengenceran pertama

n2 = jumlah cawan terhitung pada pengenceran kedua

d = pengenceran pertama yang terhitung.

Produksi bakteriosin

Analisis produksi bakteriosin menggunakan metode Usmiati dan Rahayu (2011). Sebanyak 1 ml hasil peremajaan masing-masing BAL diinokulasi dalam 9 ml MRSB, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C,

kemudian sebanyak 4 ml kultur BAL berumur 24 jam diinokulasikan pada 36 ml media kerja MRSB, diinkubasi pada suhu 37°C selama 9 jam dengan shaker inkubator. Setelah itu, pH diatur hingga 6,0 dengan menggunakan NaOH 1N, dipanaskan pada suhu 80°C dan 100°C selama 15 menit, diinkubasi pada suhu 4°C selama 24 jam, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. pH diatur kembali menjadi 4,0 dengan menggunakan HCl 1N, selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 4°C selama 24 jam, disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan selanjutnya disaring menggunakan millipore 0,20 µm dan didapatkan ekstrak kasar bakteriosin.

Pengujian aktivitas bakteriosin metode difusi sumur agar

Uji aktivitas bakteriosin sesuai dengan metode difusi sumur agar (modifikasi Delgado *et al.*, 2005). Bakteri indikator berumur 24 jam diencerkan dalam larutan garam fisiologis hingga berjumlah 10⁹ cfu/ml. Sebanyak 1 ml suspensi bakteri indikator yang diperoleh diinokulasikan ke dalam 15-20 ml PCA dengan cawan tuang. Setelah agar memadat, dibuat sumur berdiameter 6 mm dengan menggunakan alat sumuran (*cokr borer*). Sampel ekstrak bakteriosin yang akan diuji diambil sebanyak 50 µl dan dimasukkan ke dalam sumur pada media uji dan dibiarkan hingga sampel berdifusi, kemudian cawan agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas bakteriosin akan terlihat dengan munculnya zona bening di sekitar sumur. Unit aktivitas bakteriosin dapat didefinisikan dalam *Arbitrary Unit* per ml (AU/ml). 1 AU per ml merupakan luas daerah hambatan per satuan volume sampel bakteriosin yang diuji (Tagg dan McGiven, 1971). Aktivitas bakteriosin dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas bakteriosin (AU/ml)} = \frac{L_z - L_s}{V}$$

Keterangan:

Lz = luas zona bening (mm²)

V = volume sampel bakteriosin (ml)

Ls = luas sumur (mm²).

Selanjutnya, data dilakukan analisis ragam (rancangan blok acak lengkap) dengan faktor I galur kultur produsen, masing-masing

dengan 3 ulangan (U1, U2, U3) dan faktor II suhu produksi, masing-masing suhu dengan 2 ulangan (U1 dan U2). Analisis ragam ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh dari kedua faktor tersebut terhadap aktivitas penghambatan ekstrak bakteriosin yang dihasilkan.

Hasil dan Pembahasan

Penghitungan total populasi kultur

Jumlah populasi kultur BAL disajikan pada Tabel 1 dan jumlah populasi bakteri indikator dapat dilihat pada Tabel 2. Dari Tabel 1 diketahui bahwa kultur *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211 yang digunakan memiliki jumlah koloni terbanyak dari ketiga kultur BAL, yaitu sebanyak $1,5 \times 10^7$ cfu/ml. Kultur *Lactobacillus* sp. galur SCG 1221 dan galur SCG 1223 memiliki jumlah koloni yang hampir sama banyaknya, yaitu berturut-turut sebanyak $5,6 \times 10^6$ cfu/ml dan $6,7 \times 10^6$ cfu/ml. Tabel 2 menunjukkan bahwa kultur *E. coli* yang berumur 24 jam memiliki populasi sebanyak $11,6 \times 10^{12}$ cfu/ml, sedangkan kultur *S. aureus* yang berumur 24 jam memiliki populasi sebanyak $6,6 \times 10^{13}$ cfu/ml.

Hasil penghitungan populasi semua kultur bakteri menunjukkan bahwa kultur bakteri produsen memiliki populasi yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kultur bakteri indikator. Hal tersebut disebabkan kultur induk BAL yang digunakan merupakan hasil peremajaan dari kultur cair yang telah disimpan cukup lama pada suhu 4°C dan bukan merupakan hasil peremajaan dari isolat segar, sedangkan kultur bakteri indikator yang digunakan merupakan hasil peremajaan dari kultur yang diawetkan dalam manik-manik. Oleh karena itu, diperlukan waktu lebih lama untuk pengkondisian dan peremajaan kultur

BAL agar didapatkan kultur dengan populasi lebih tinggi. Selain itu, tahap penghitungan jumlah populasi kultur membutuhkan waktu inkubasi lebih dari 24 jam, di mana waktu tersebut merupakan fase kematian bagi kultur BAL. Pada fase kematian, kultur BAL mengalami penurunan jumlah populasi (Januarsyah, 2007). Namun demikian, tidak ada standar minimal jumlah populasi kultur produsen yang dibutuhkan untuk memproduksi bakteriosin.

Produksi dan pengujian ekstrak kasar bakteriosin

Produksi bakteriosin dilakukan setelah jam ke sembilan inkubasi. Hal ini dilakukan karena pada jam ke sembilan hingga ke sepuluh merupakan akhir fase logaritmik hingga awal fase stasioner (Januarsyah, 2007). Bakteriosin umumnya diproduksi secara optimal oleh bakteri asam laktat pada akhir fase logaritmik hingga awal fase stasioner (Jimenez-Diaz, 1993 *cit.* Januarsyah, 2007). Ekstrak kasar bakteriosin pada penelitian ini diproduksi dengan menerapkan prinsip metode adsorpsi-desorpsi (Yang *et al.*, 1992 *cit.* Usmiati dan Rahayu, 2011). Prinsipnya adalah pada pH sekitar netral senyawa pre-bakteriosin akan menempel pada permukaan sel bakteri produser (atau disebut sebagai proses adsorpsi), kemudian pada pH rendah akan terjadi pelepasan senyawa bakteriosin dari sel bakteri produser ke lingkungannya (atau disebut sebagai proses desorpsi).

Produksi bakteriosin diawali dengan pengaturan pH netral (7,00) pada kultur kerja untuk proses adsorpsi, kemudian dilakukan pemanasan 15 menit pada suhu 80°C dan 100°C. Hal ini bertujuan untuk mematikan sel

Tabel 1. Populasi kultur bakteri produsen bakteriosin
(population of bacteria culture produce bacteria)

Bakteri (bacteria)	Jumlah koloni (cfu/ml) (colony number (cfu/ml))
<i>Lactobacillus</i> sp. galur SCG 1211	$1,5 \times 10^7$
<i>Lactobacillus</i> sp. galur SCG 1221	$5,6 \times 10^6$
<i>Lactobacillus</i> sp. galur SCG 1223	$6,7 \times 10^6$

Tabel 2. Populasi kultur bakteri indikator
(population of indicator bacteria)

Bakteri (bacteria)	Jumlah koloni (cfu/ml) (colony number (cfu/ml))
<i>E. coli</i>	$11,6 \times 10^{12}$
<i>S. aureus</i>	$6,6 \times 10^{13}$

produsen agar tidak terus berkembang selama proses ekstraksi bakteriosin. Proses-proses selanjutnya dilakukan pada suhu 4°C. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan antara supernatan dengan massa sel bakteri produsen. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak bakteriosin. pH supernatan kemudian diatur menjadi pH rendah (4,00) untuk proses desorpsi. Selanjutnya disentrifugasi kembali dan supernatan disaring menggunakan filter millipore 0,20 µm dan didapatkan supernatan bakteriosin bebas sel atau disebut juga sebagai ekstrak kasar bakteriosin. Ketiga jenis sampel ekstrak bakteriosin yang dihasilkan tidak terlihat perbedaannya jika dilihat secara visual. Ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan berwarna kuning jernih, yang berasal dari warna media MRSB yang digunakan untuk produksi ekstrak kasar bakteriosin.

Ketiga ekstrak kasar bakteriosin diuji untuk menghambat bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Pengujian aktivitas penghambatan dilakukan dengan metode difusi sumur agar. Masing-masing ekstrak kasar bakteriosin diuji secara duplo sebanyak tiga kali ulangan. Aktivitas penghambatan dapat terlihat dari zona bening yang muncul di sekitar sumur agar setelah diinkubasi. Hasil pengujian aktivitas penghambatan ekstrak kasar bakteriosin disajikan pada Tabel 3 dalam bentuk hasil pengukuran diameter zona bening (mm).

Secara umum, ketiga jenis sampel ekstrak kasar menghasilkan rerata zona bening atau zona hambat dengan diameter 9,0±0,0 hingga 10,0±0,0 mm. Sampel ekstrak

kasar bakteriosin dari galur SCG 1211 menghasilkan zona hambat dengan diameter 9,5±0,0 hingga 10,0±0,0 mm. Sampel ekstrak kasar bakteriosin dari galur SCG 1221 menghasilkan zona hambat dengan diameter 9,0±0,0 hingga 9,5±0,0 mm. Sedangkan sampel ekstrak kasar bakteriosin dari galur SCG 1223, zona hambat yang dihasilkan memiliki diameter 9,0±0,0 hingga 9,5±0,0 mm. Terlihat bahwa ekstrak kasar bakteriosin dari galur SCG 1211 menghasilkan zona hambat dengan diameter yang relatif lebih besar.

Ponce *et al.* (2007) menyatakan jika sampel yang diujikan menunjukkan adanya zona bening berdiameter lebih besar dari 6 mm di sekeliling sumur maka dapat dikatakan sampel tersebut positif menghambat bakteri indikator. Tidak terdapat ketentuan khusus diameter zona hambat atau aktivitas hambat (AU/ml) minimal yang disyaratkan untuk bakteriosin agar dapat dikatakan sebagai agen biopreservatif (Usmiati dan Rahayu, 2011).

Pada luas zona hambat dapat diketahui aktivitas penghambatan ekstrak kasar bakteriosin. Semakin besar zona hambat yang dihasilkan maka semakin besar pula aktivitas penghambatan sampel ekstrak bakteriosin. Aktivitas ekstrak kasar bakteriosin (AU/ml) dalam menghambat *E. coli* disajikan pada Tabel 4 dan aktivitas ekstrak kasar bakteriosin (AU/ml) dalam menghambat *S. aureus* disajikan pada Tabel 5.

Secara keseluruhan, ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan memiliki aktivitas untuk menghambat bakteri *E. Coli* sebesar

Tabel 3. Rerata zona bening pengujian daya hambat bakteriosin
(the mean of a clear zone of inhibition testing bacteriocins)

Galur (furrow)	Diameter zona bening (mm) (clear zone diameter (mm))			
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Suhu 80°C (temperature 80°C)	Suhu 100°C (temperature 80°C)	Suhu 80°C (temperature 80°C)	Suhu 100°C (temperature 100°C)
SCG 1211	9,58±0,49	9,50±0,00	10,0±0,00	9,83±0,50
SCG 1221	9,00±0,00	9,00±0,00	9,50±0,00	9,50±0,00
SCG 1223	9,00±0,00	9,00±0,00	9,50±0,00	9,50±0,00

Tabel 4. Aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E. coli*
(bacteriocin inhibitory activity against *E. coli*)

Galur (furrow)	Aktivitas hambat (AU/ml) (inhibitory activity (AU/ml))	
	80°C	100°C
SCG 1211	828,78±4,93	853,01±0,00
SCG 1221	707,66±0,00	707,66±0,00
SCG 1223	707,66±0,00	707,66±0,00

Tabel 5. Aktivitas hambat bakteriosin terhadap *S. aureus*
(bacteriocin inhibitory activity against *S. aureus*)

Galur (<i>furrow</i>)	Aktivitas hambat (AU/ml) (<i>inhibitory activity (AU/ml)</i>)	
	80°C	100°C
SCG 1211	1033,075±1,89	955.156±3,06
SCG 1221	853,01±0,00	853,01±0,00
SCG 1223	853,01±0,00	853,01±0,00

707,66±0,0 hingga 853,01±0,0 AU/ml dan *S. aureus* sebesar 853,01±0,0 hingga 1033,075±1,89 AU/ml. Artinya, setiap 1 ml ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* seluas 707,66±0,0 mm² hingga 853,01±0,0 mm² dan setiap 1 ml ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* seluas 853,01±0,00 mm² hingga 1033,075±1,89 mm².

Ekstrak kasar bakteriosin dari galur SCG 1211 yang diproduksi pada suhu 80°C memiliki rerata aktivitas hambat sebesar 828,78±4,93 AU/ml terhadap *E. coli* dan 1033,075±1,89 AU/ml terhadap *S. aureus*. Tidak berbeda jauh dengan ekstrak kasar yang diproduksi pada suhu 100°C, memiliki aktivitas hambat sebesar 853,01±0,0 AU/ml terhadap *E. coli* dan 955,156±3,06 AU/ml terhadap *S. aureus*. Ekstrak kasar bakteriosin dari galur SCG 1221 dan SCG 1223 yang diproduksi pada suhu 80°C maupun 100°C, memiliki rerata aktivitas hambat yang sama, yaitu sebesar 707,66 ±0,0 AU/ml terhadap *E. coli* dan 853,01 AU/ml terhadap *S. aureus*.

Dilihat dari aktivitas hambatnya, ekstrak kasar bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211, SCG 1221, dan SCG 1223 cukup berpotensi sebagai biopreservasi, khususnya jika diaplikasikan pada kemasan produk pangan (kemasan aktif). Ekstrak kasar bakteriosin masih merupakan hasil purifikasi parsial. Jika dipekatkan menjadi bentuk bubuk atau dilakukan tahap purifikasi lebih lanjut, diduga akan menghasilkan bakteriosin dengan aktivitas hambat yang lebih besar lagi. Bubuk bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1223 memiliki aktivitas hambat yang meningkat hingga 142% lebih besar dari bentuk ekstrak kasarnya (Nasution, 2009). Lactacin B, bakteriosin yang dihasilkan dari *Lactobacillus acidophilus*, memiliki aktivitas hambat sebesar 128 AU/ml saat masih berupa ekstrak kasar dan meningkat menjadi 8192 AU/ml setelah dilakukan purifikasi lebih lanjut dengan *carboxymethyl* Sepadhex™ (Barefoot *et al.*, 1994). Bakteriosin yang dihasilkan dari *Bacillus megaterium* meng-

hasilkan zona bening hingga 11 mm (atau 1334,5 AU/ml) dalam menghambat *E. coli* dan *S. aureus*, serta mampu mereduksi pertumbuhan *S. aureus* hingga 76% (Khalil *et al.*, 2009).

Pengaruh faktor galur kultur produsen dan faktor suhu produksi terhadap aktivitas penghambatan ekstrak bakteriosin yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 6. Hasil analisis menunjukkan bahwa faktor galur kultur produsen berbeda nyata ($P \leq 0,05$). Hal tersebut dapat diartikan galur kultur produser termasuk faktor yang mempengaruhi aktivitas hambat ekstrak kasar bakteriosin. Sementara itu, faktor suhu produksi tidak berbeda nyata ($P \geq 0,05$) atau dapat diartikan bahwa suhu produksi bukan merupakan faktor yang mempengaruhi aktivitas hambat ekstrak bakteriosin.

Pengaruh perbedaan galur kultur produser terhadap aktivitas hambat ekstrak kasar bakteriosin

Ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan oleh galur kultur yang berbeda memiliki aktivitas hambat yang berbeda pula besarnya. Perbedaan tersebut dapat dilihat pada Tabel 4 yang menunjukkan bahwa ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan oleh *Lactobacillus* sp. galur SCG 1221 memiliki rerata aktivitas hambat yang sama besarnya dengan ekstrak kasar bakterison yang dihasilkan oleh galur SCG 1223, yaitu sebesar 707.66±0 AU/ml terhadap *E. coli* dan 853.01±0,0 AU/ml terhadap *S. aureus*, sedangkan ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan oleh galur SCG 1211 memiliki rerata aktivitas hambat paling besar yaitu sebesar 853,01±0,0 AU/ml terhadap *E. coli* dan 1033,075±1,89 AU/ml terhadap *S. aureus*. Hasil analisis Duncan menunjukkan bahwa galur SCG 1221 dan SCG 1223 berada pada subset yang sama, sedangkan galur SCG 1211 berada pada subset yang berbeda. Hal ini dapat diartikan bahwa galur SCG 1211 berbeda nyata dengan galur SCG 1221 maupun dengan galur SCG 1223,

sedangkan galur SCG 1221 tidak berbeda nyata dengan galur SCG 1223.

Pada waktu dan kondisi inkubasi yang sama, kultur *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211 yang digunakan memiliki jumlah koloni paling banyak jika dibandingkan dengan kedua galur lainnya (Tabel 1). Jumlah koloni/biomassa yang lebih banyak akan menghasilkan senyawa bakteriosin yang lebih banyak pula dan aktivitas hambatnya pun akan lebih besar. Hal inilah yang mempengaruhi besarnya aktivitas hambat ketiga ekstrak kasar bakteriosin. Ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan dari sel produsen dengan banyak koloni akan memiliki aktivitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan bakteriosin yang dihasilkan dari sel produsen yang lebih sedikit jumlah koloninya, dalam volume yang sama. Hal ini didukung hasil penelitian Usmiati dan Marwati (2007) yang menunjukkan bahwa kultur *Lactobacillus* sp. galur SCG 1223 yang memiliki populasi sebanyak $4,77 \times 10^{14}$ cfu/ml menghasilkan ekstrak kasar bakteriosin dengan aktivitas hambat sebesar 2767,12 AU/ml terhadap *E. coli*.

Pengaruh perbedaan suhu produksi terhadap aktivitas hambat ekstrak kasar bakteriosin

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan aktivitas hambat ekstrak kasar bakteriosin dengan suhu produksi 80°C dan 100°C pada taraf kepercayaan 95%. Pada Gambar 1 dapat dilihat bahwa aktivitas hambat ekstrak kasar bakteriosin yang diproduksi dengan suhu 80°C memiliki pola yang relatif sama dengan yang diproduksi pada 100°C. Oleh karena aktivitas hambatnya tidak mengalami perbedaan, maka tahap pemanasan pada produksi ekstrak kasar bakteriosin dapat menggunakan suhu 80°C untuk efisiensi energi.

Penelitian Lee *et al.* (1999) menunjukkan bahwa beberapa bakteriosin yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat menunjukkan aktivitas hambat yang stabil pada suhu pemanasan 100°C selama 30 menit atau 121°C selama 10 menit. Campos *et al.* (2006) melaporkan bahwa bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. lactis* dan *E. faecium* masih menunjukkan aktivitas hambat yang stabil dalam menghambat *S. aureus* setelah dipanaskan 100°C selama 60 menit.

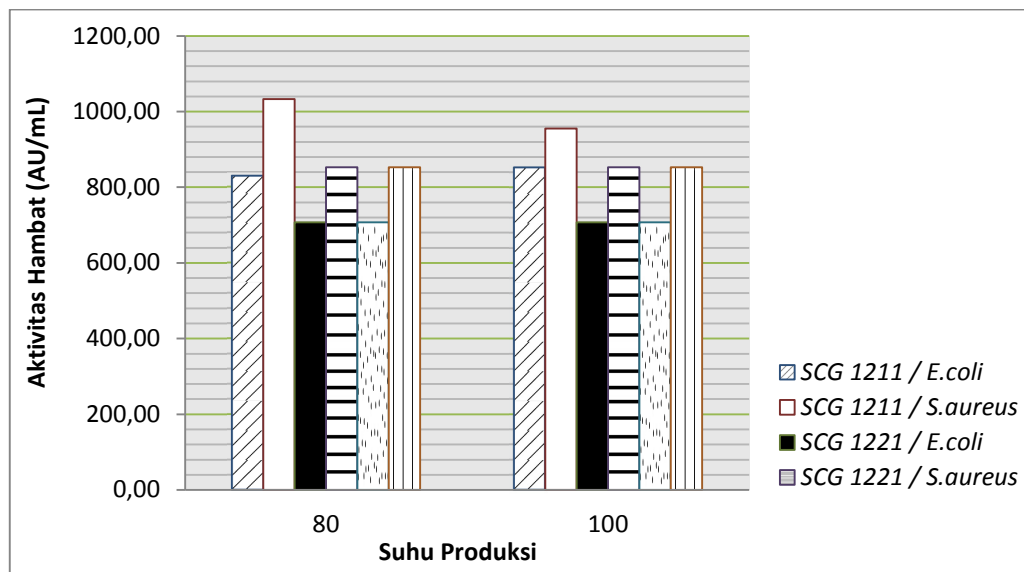
Mekanisme kestabilan bakteriosin terhadap panas terkait dengan struktur molekul bakteriosin yang merupakan peptida sederhana tanpa struktur tersier. Stabilitas panas ini disebabkan oleh adanya daerah yang sangat hidrofobik, ikatan silang yang stabil, dan tingginya kandungan asam amino glisin (De Vuyst dan Vandamme, 1994). Stabil terhadap panas merupakan salah satu karakteristik bakteriosin yang diperlukan sebagai biopreservasi pangan. Umumnya proses produksi pangan menggunakan suhu pemanasan cukup tinggi. Ekstrak kasar bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211, SCG 1221, dan SCG 1223 ini menunjukkan kestabilan aktivitas hambat setelah melalui pemanasan 100°C selama 15 menit, maka ekstrak kasar bakteriosin tersebut juga berpotensi sebagai biopreservasi pada produk pangan yang menggunakan proses pemanasan.

Perbedaan penghambatan ekstrak kasar bakteriosin terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

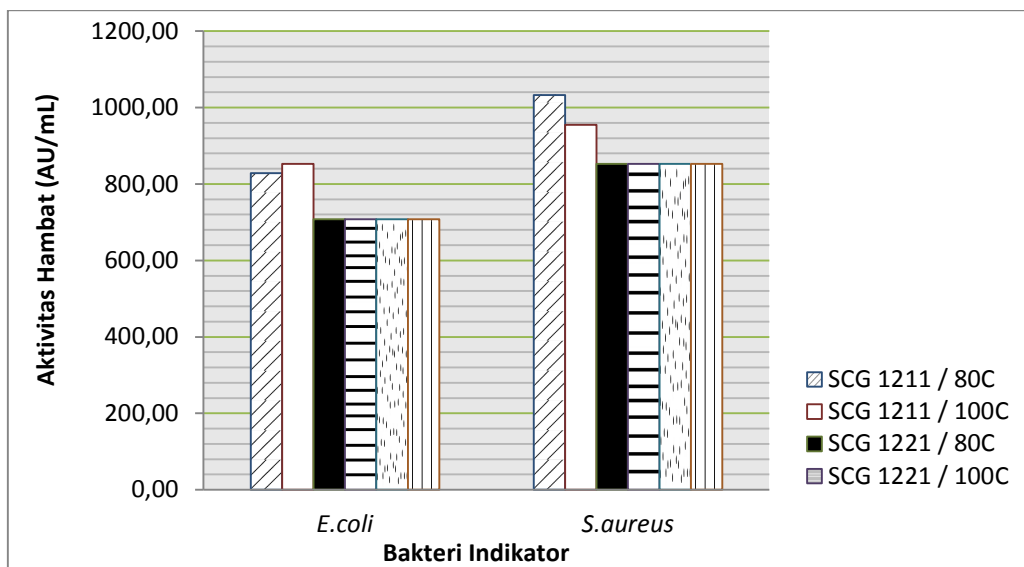
Pola diagram batang pada Gambar 2 menunjukkan bahwa ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan ketiga jenis galur yang berbeda memiliki aktivitas yang lebih tinggi dalam menghambat *S. aureus* dibandingkan dengan *E. coli*. Hal tersebut disebabkan adanya perbedaan antara bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. *E. coli* merupakan jenis bakteri gram negatif, sedangkan *S. aureus* merupakan jenis bakteri gram positif.

Escherichia coli merupakan mikroba gram negatif yang berbentuk batang lurus, berukuran $1,1-1,5 \mu\text{m} \times 2,0-6,0 \mu\text{m}$, biasanya tidak berkapsul, tidak membentuk spora, penghuni normal usus, mudah tumbuh pada media pertumbuhan sederhana (Pelczar dan Chan, 2008). Bakteri ini seringkali menyebabkan diare akut. *E. coli* yang menyebabkan diare akut dapat dikelompokkan menjadi *enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC), *enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), *enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC), dan *entero-aggregative Escherichia coli* (EAEC).

Bakteri dari gram negatif lebih sulit dirusak oleh bakteriosin karena memiliki membran luar pada dinding selnya. Membran luar ini berperan sebagai *barrier* permeabel. Membran ini bertanggung jawab untuk mencegah masuknya molekul seperti antibiotik,



Gambar 1. Diagram batang rerata aktivitas hambat bakteriosin berdasarkan suhu produksi (bar chart bacteriocins mean inhibitory activity based on the temperature of production).



Gambar 2. Diagram batang rerata aktivitas hambat bakteriosin terhadap *E.coli* dan *S. aureus* (bar chart bacteriocins mean inhibitory activity against *E. coli* and *S. aureus*).

deterjen, enzim pencernaan, ke dalam membran sitoplasma (Parada *et al.*, 2007). Aktivitas yang dimiliki oleh ekstrak kasar bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211, SCG 1221, dan SCG 1223 dalam menghambat *E. coli* ini diduga karena adanya sisi aktif pada bakteriosin yang bersifat sangat hidrofobik (atau bermuatan negatif), sehingga mampu mengikat Mg^{2+} pada membran luar *E. coli*. Terikatnya ion-ion Mg^{2+} oleh bakteriosin akan menghilangkan integritas

lapisan lipopolisakarida dan merusak membran luar dinding sel *E. coli* (Tortora *et al.*, 2007).

S. aureus merupakan mikrobia gram positif yang berbentuk bola (kokus), berdiameter 0,5-1,5 μm , dinding selnya mengandung dua komponen utama yaitu peptidoglikan dan asam tekoat yang berkaitan dengannya (Pelczar dan Chan 2008). Penghambatan bakteri gram positif oleh bakteriosin diduga melalui mekanisme berupa

pembentukan kompleks antara bakteriosin asam lipotekoat yang terdapat pada dinding sel bakteri gram positif, untuk mengawali insersi kerusakan membran sel bakteri tersebut. Asam lipotekoat yang merupakan jenis dari asam tekoat, diduga merupakan reseptor spesifik dan terkait dengan pengikatan senyawa bakteriosin, baik pada bakteri gram positif yang resisten maupun sensitif (Bhunja *et al.*, 1991 *cit.* Usmiati dan Rahayu, 2011).

Selain itu, bakteriosin umumnya bersifat kationik (karena mengandung residu lisil dan arginil yang berlebih) yang tersusun dari 12-45 asam amino (Moll *et al.*, 1999). Sementara itu, bakteri gram positif mengandung lipid anionik pada membrannya. Lipid atau fosfolipid anionik inilah yang diikat dengan cepat oleh bakteriosin, sehingga menginisiasi terjadinya kerusakan membran sel bakteri (Moll *et al.*, 1999). Kedua hal tersebut menyebabkan bakteri gram positif mudah diserang atau dihambat oleh bakteriosin. Setelah terjadi pengikatan antara membran sel atau sel reseptor bakteri oleh bakteriosin, terjadi pembentukan lubang, kemudian sel bakteri mengalami degradasi DNA seluler, pemotongan spesifik pada 16S rDNA, dan penghambatan sintesis peptidoglikan. Pada akhirnya sel akan mengalami lisis atau kematian (De Vuyst dan Vandamme, 1994).

Kesimpulan

Suhu pemanasan 80°C maupun 100°C, tidak mempengaruhi aktivitas hambat ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan. Ekstrak kasar bakteriosin memiliki rerata aktivitas hambat paling tinggi dihasilkan oleh *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211, yaitu sebesar 853,01±0,0 AU/ml terhadap *E. coli* dan 1033,075±1,89 AU/ml terhadap *S. aureus*. Ekstrak kasar bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1221 memiliki aktivitas hambat yang sama besar dengan galur SCG 1223, yaitu sebesar 707,66±0,0 AU/ml terhadap *E. coli* dan 853,01±0,0 AU/ml terhadap *S. aureus*. Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak kasar bakteriosin yang dihasilkan dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1211, SCG 1221, dan SCG 1223 dapat dinilai positif menghambat bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan metode difusi sumur agar.

Ucapan Terima Kasih

Terimakasih disampaikan kepada N. Hadiyana, alumni Fakultas Teknologi Pertanian, IPB Bogor dan Marman Wahyudi, teknisi Balai Besar Litbang Pascapanen Pertanian, Bogor yang telah membantu penelitian ini hingga selesai.

Daftar Pustaka

- FDA. 2001. Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, DC.
- Barefoot, S. F., C. G. Nettles and Y. R. Chen. 1994. Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics, and applications. De Vuyst L. and E. Vandamme (eds). Blackie Academic and Professional, London, pp. 353-376.
- Campos, A., O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado and J. Barros-Velazquez. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta maxima). Food Research International 39: 356-364.
- De Martinis, E. C. P., M. R. P. Públio, P. R. Santarosa and F. Z. Freitas. 2001. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. Braz. J. Microbiol. 32: 32-37.
- De Vuyst, L. and E. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics, and applications. De Vuyst L. and E. Vandamme (eds). Blackie Academic and Professional, London, pp. 91-142.
- De Vuyst, L. and F. Leroy 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J. Molecular Microbiol. Biotechnol. 13: 194-199.
- Delgado, A., D. Brito, P. Fevereiro, R. Tenreiro, C. Peres. 2005. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. J. Microbiological Methods 62: 121-124.

- Januarsyah, T. 2007. Kajian aktivitas hambat bakteriosin dari bakteri asam laktat galur SCG 1223. Skripsi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Khalil, R., Y. Elbahloul, F. Djadouni and S. Omar 2009. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. Pakistan J. Nutrition 8: 242-250.
- Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39-85.
- Lee, H. J., Y. J. Joo, C. S. Park, S. H. Kim, I. K. Hwang, J. S. Ahn and T. I. Mheen. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from kimchi. J. Biosci. Bioengineering 88: 153-159.
- Moll, G. N., W. N. Konings and A. J. M. Driessen. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. J. Antonie van Leeuwenhoek 76: 185-198.
- Nasution, S. R. 2009. Kajian aktivitas hambat pertumbuhan bakteri patogen oleh serbuk bakteriosin yang dihasilkan bakteri asam laktat galur SCG 1223. Skripsi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nurhasanah. 2004. Produksi bakteriosin pada berbagai tingkat aerasi dan uji kestabilan bakteriosin dari bakteri asam laktat Galur M6-15. Skripsi Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Parada, J. L., C. R. Caron, A. B. P. Medeiros and C. R. Soccol. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties, and use as biopreservatives. Brazilian Archives of Biology Technol. 50: 521-542.
- Pelczar, M. J. Jr. and E. C. S. Chan. 2008. Dasar-Dasar Mikrobiologi II. Penerjemah: Hadioetomo R. S, Imas T, Tjitrosomo S. S, Angka S. L. Terjemahan dari: Elements of Microbiology, UI Press, Jakarta.
- Ponce, A. G, M. R. Moreira, C. E. Del Valle and S. I. Roura. 2007. Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organ is leafy vegetables. J. LWT 41: 432-441.
- Tagg, J. R. and A. R. McGiven. 1971. Assay System for Bacteriocins. J. Appl. Microbiol. 21: 943.
- Todorov, S. D. and L. M. T. Dicks. 2004. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. J. Basic Microbiol. 44: 305-316.
- Tortora, G. J., B. R. Funke and C. L. Case 2007. Microbiology: an Introduction, 9th edn. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco, p.88.
- Usmiati, S. dan T. Marwati 2007. Seleksi dan optimasi proses produksi bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. Jurnal Pascapanen 4: 27-37.
- Usmiati, S. dan W. P. Rahayu. 2011. Aktivitas hambat bubuk ekstrak bakteriosin dari *Lactobacillus* sp. galur SCG 1223. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner, Puslitbangnak.